

527, 597

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 1 日 (01.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/026343 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 48/00, 31/7088, 47/42, 9/08, 9/14, A61P 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011962
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 19 日 (19.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-274926 2002 年 9 月 20 日 (20.09.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府 大阪市 中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号 Osaka (JP). 株式会社高研 (KOKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒171-0031 東京都 豊島区 目白 3 丁目 1 4 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 安東 由喜雄 (ANDO, Yukio) [JP/JP]; 〒861-5514 熊本県 熊本市 飛田 1 丁目 1-52 Kumamoto (JP). 中村 政明 (NAKA-MURA, Masaaki) [JP/JP]; 〒860-0075 熊本県 熊本市 稗田 5-68-801 Kumamoto (JP). 永原 俊治 (NAGA-HARA, Shunji) [JP/JP]; 〒567-0841 大阪府 茨木市 桑田 2-1-3-348 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 鈴木 崇生, 外 (SUZUKI, Takao et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 7 丁目 1-20 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: SITE-SPECIFIC GENE CONVERSION PROMOTER AND GENE THERAPEUTIC

(54) 発明の名称: 部位特異的遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤



(a) 0.01%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド
(b) 0.1%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド
(c) HVJ-リボソーム封入DNAオリゴヌクレオチド

(a)... DNA OLIGONUCLEOTIDE EMBEDDED IN 0.01% ATELOCOLLAGEN
(b)... DNA OLIGONUCLEOTIDE EMBEDDED IN 0.1% ATELOCOLLAGEN
(c)... DNA OLIGONUCLEOTIDE ENCAPSULATED IN HVJ-LIPOSOME

(57) Abstract: It is intended to provide a preparation whereby an oligonucleotide is efficiently transferred into a cell and the localization thereof in nucleus is promoted, a preparation promoting the conversion of the base sequence of a target genomic gene, and a gene therapeutic. Namely, a site-specific gene conversion promoter which contains at least collagen and an oligonucleotide for gene conversion; a site-specific gene therapeutic which contains at least collagen and an oligonucleotide for gene conversion; a method of arbitrarily converting a specific base on a genomic gene in the nucleus of a cell which comprises bringing the above-described gene conversion promoter into contact with the cell; and an oligonucleotide nuclear localization promoter which contains at least a collagen and an oligonucleotide.

(57) 要約: オリゴヌクレオチドを細胞内に効率的に導入して核内での局在化を促進する製剤、目的とするゲノム遺伝子の塩基配列の変換を促進する製剤および遺伝子疾患治療剤を提供する。少なくともコラーゲンと遺伝子変換用

[続葉有]

WO 2004/026343 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤、少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤、細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法であって、前記遺伝子変換促進剤を当該細胞に接触させることを含む方法、および少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤。

明細書

部位特異的遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤

技術分野

本発明は、コラーゲンの新しい用途に関するものであり、詳しくは、コラーゲンとオリゴヌクレオチドを含有する、ゲノム遺伝子の部位特異的遺伝子変換促進剤等に関する。

背景技術

遺伝子治療は、遺伝子の変異または欠失により発症する遺伝子疾患を根本的に治療する方法として大きな期待が寄せられている。一般に、遺伝子治療ではウイルスベクター、リポソームベクターまたはプラスミドDNAベクター等を用いて細胞に治療に必要なタンパク質をコードした遺伝子を導入し、細胞のゲノム遺伝子に組み込む手法、あるいはゲノム遺伝子と共存させてタンパク質を発現させる手法が試みられているが、満足な治療効果が得られる例は少ない。この原因は、1) タンパク質全体をコードする大きなサイズの遺伝子をウイルスベクターあるいはプラスミドDNAに組み込んで発現させるのは困難であること、2) 導入する遺伝子をゲノム遺伝子に組み込まないアデノウイルスベクターやプラスミドDNAベクターを用いた場合には、安定した長期間の発現が得られないこと、3) レトロウイルスベクターは導入する遺伝子をゲノム遺伝子の不特定の位置に組み込むため、却って正常遺伝子の機能を喪失させる可能性があること、4) ウイルスベクターを用いた場合、ウイルスに由来するタンパク質が産生され、このタンパク質に対する免疫反応が惹起されて副作用が生じること、5) 更にプロモーターは細胞の特異性が高いため、遺伝子を発現できる細胞が限られることによると考えられている (Li-Wen Laiら、「Experimental Nephrology」1999 第7巻, p. 11-14)。

一方、遺伝子疾患では必要とされるタンパク質の遺伝子すべてが完全に欠失していることは稀で、多くの場合には遺伝子上の僅か一塩基が誤っているために異なるアミノ酸に置換されたり、一塩基が欠失あるいは挿入されているためにフレ

ームシフトが生じて正常なタンパク質が産生されないことが原因となっている。例えば、家族性アミロイドポリニューロパチー(Familial amyloidotic polyneuropathy: FAP)は、遺伝子変異を起こしたトランスサイレチン(Transthyretin: TTR)、アポリポ蛋白A I、ゲルソリンを前駆蛋白とし、種々の臓器・組織にアミロイド沈着をきたす全身性アミロイドーシスの1つである。そのうち、127個のアミノ酸から構成されるTTRの30番目のバリンがメチオニンへ変異した異型TTRがアミロイドとなり臓器障害がおこるFAP type I (FAP ATTR Val30Met)は、四肢の感覚障害や運動神経障害を伴う多発神経炎、立ちくらみ、発汗、涙液分泌低下などの自律神経障害、下痢や便秘などの消化器症状、心、腎、眼などの臓器障害などを主症状とする常染色体優性遺伝を呈する遺伝性アミロイドーシスである。本症は20～30代で発症し、約10年の経過で死の転帰をとる予後不良の疾患である(Bensonら、「Trends in Neurosciences」1989 第12巻, p. 88-92)。

FAPの原因蛋白であるTTRが主に肝臓で産生されることから、FAPの治療として肝移植が行われるようになった。肝移植によりFAPの症状の進行が停止し、一部の自律神経症状の改善を認めることから、肝臓での異型TTRの産生を抑制することは、FAPの有効な治療法であることが明らかになった。しかしながら、肝移植をすべての患者に適応することは様々な理由から不可能である。しかも、網膜での異型TTRの産生は抑制されないため、肝移植後も眼病変が進行するという問題点もある。そこで、これに代わる治療法として、肝臓、網膜での異型TTRの産生を抑制する遺伝子治療の確立が不可欠であると考えられる。

他方、ヒトゲノムプロジェクトによってヒトの全遺伝子配列が解読されるようになり、個体間で多くの一塩基変異があることが見出され、更にこの一塩基変異が疾病の罹患率や薬剤の感受性に大きく影響することが明らかになりつつある。従って遺伝子治療を実用化するには、ゲノム遺伝子上の特定の一塩基変異を修正する技術の確立が必要である。

1996年、Kmiec らによって特定の塩基を変異する画期的な方法が発表された (Kmiec ら、「Science」1996 第273巻, p. 1386-1389)。RNA-DNAキメ

ラオリゴヌクレオチドを用いるこの方法は、変異させたい遺伝子の領域と二重鎖を形成するオリゴヌクレオチドを細胞内に導入してゲノム遺伝子と相同組換えを生じさせることでゲノム遺伝子を変異させる方法であり、リンパ芽球細胞にオリゴヌクレオチドを導入して遺伝子疾患である鎌状細胞貧血の原因遺伝子であるβ-グロビンの遺伝子を変異させた。この報告以降、オリゴヌクレオチドを用いて種々の細胞内で特定の塩基を標的とした遺伝子変異が行えることが実証された。更にin vivo においては、Krenらがラットの肝臓内で第9因子の遺伝子を変異させて血友病を治療できる可能性を示した (Krenら、*「Nature Medicine」* 1998 第4巻, p. 285-290) のに続いて、Cligler-Najjar症候群 (Krenら、*「Proceeding of National Academy of Sciences USA」* 1999 第96巻, p. 10349-10354)、Duchenne型筋ジストロフィーの治療に使用できる可能性が示されるに至っている。

また、最近DNAオリゴマーでもRNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドと同様にゲノム遺伝子の特定の塩基を変異できることが、細胞の抽出液中 (Gamperら、*「Nucleic Acids Research」* 2000 第28巻, p. 4332-4339)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Michaelら、*「Nucleic Acids Research」* 2001 第29巻, p. 4238-4250) で示され、遺伝子治療への活用が期待されている。

しかしながら、RNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドを単独で用いて相同組換えを行うこの方法は、再現性がなく、これら論文に報告されているような高い効率で相同組換えを行うことができないことは当該領域の研究者の共通の認識である。実際、Kmiecらの論文を最初に掲載した*Science* 誌は、彼らが発表した論文の追跡調査を実施し、論文の内容が再現されないことを確認したとの記事を掲載した。また、その記事の中で最近のKmiecらの研究によれば、RNA-DNAキメラオリゴヌクレオチドを単独で用いた場合の相同組換え効率は、0.0002%~0.005%、DNAオリゴマーを単独で用いた場合の相同組換え効率は、0.016%~0.02% 程度であることを明らかにしている (Taubes、*「Science」* 2002 第298巻, p. 2116-2120)。従って、これらオリゴヌクレオチドを用いて効率的に相同組換えを行う促進システムの開発が求められている。

一方、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子治療を臨床的に実用化する上で最も大きな課題は、生体内の細胞へのオリゴヌクレオチドの送達方法である。実際、

これまで行われたすべての研究では、エレクトロポレーション、ジーンガン、リポソーム、ポリカチオンなどの送達技術を用いたオリゴヌクレオチドの細胞内導入方法は、毒性や利便性などの問題があり臨床研究に供されたものはない。特に多くのリポソーム及びカチオン性ポリマーは、オリゴマーと混合した状態で長期間保存することが困難な上、調製時の手技に導入効率が大きく依存することはこの分野の研究者には良く知られた事実である。従って、オリゴヌクレオチドを安定かつ効率的に細胞内に導入してゲノム遺伝子を変換できると共に、安全で利便性の高い送達システムの開発が求められている。

また、アンチセンスオリゴヌクレオチドの送達方法では、標的となるメッセンジャーRNAが主として細胞質に存在することから、オリゴヌクレオチドを細胞内の特定の部位に局在化することは求められなかった。一方、ゲノム遺伝子の変換を行うには、オリゴヌクレオチドを核内に導入、局在化させて遺伝子変換の効率を高める必要があり、オリゴヌクレオチドを効率的に細胞の核内に局在化させる送達システムの開発が望まれている。

発明の開示

本発明は、オリゴヌクレオチドを細胞内に効率的に導入して核内での局在化を促進する製剤、目的とするゲノム遺伝子の塩基配列の変換を促進する製剤および遺伝子疾患治療剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）の患者の発症、病態および治療方法に関する研究に長年従事し、トランスサイレチン（TTR）遺伝子の点変異によりTTRの30番目のバリンがメチオニンに変異したFAPタイプI（FAP-ATTR Val30Met）の遺伝子治療について鋭意検討した結果、下記要件を満たすことによりFAPを初めとする様々な遺伝子疾患の治療のみならず、インビトロでの部位特異的遺伝子変換にも有効な製剤を見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、以下のとおりである。

〔1〕少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤、

〔2〕少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる

部位特異的遺伝子疾患治療剤、

前記コラーゲンは水溶性コラーゲンであることが好ましく、前記水溶性コラーゲンはアテロコラーゲンであることが好ましい、

前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが少なくとも20塩基からなるオリゴヌクレオチドであることが好ましく、具体的にはRNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドまたはDNAオリゴヌクレオチドであることが好ましい、

前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドは、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基対のミスマッチ対合を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであること、あるいは、前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドは、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基の欠失または挿入を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることが好ましい、

前記ミスマッチ対合は、オリゴヌクレオチドの中央部に位置すること、あるいは、前記塩基の欠失または挿入は、オリゴヌクレオチドの中央部に位置することが好ましい、

前記促進剤または治療剤は、その剤型が溶液状であることが好ましく、リン酸塩を0.01M～0.1Mの範囲で含有すること、ナトリウム塩を0.07M～0.14Mの範囲で含有することが好ましい、

また、前記促進剤または治療剤は、剤型が固形状であることが好ましい、

遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンは粒子状の会合体であり、粒子状の会合体の長径は300nm～50μmであることが好ましい、

溶液状の前記促進剤または治療剤は、コラーゲンを0.01～1.0重量%の範囲で含有すること、あるいはコラーゲンを0.01～0.25重量%の範囲で含有することが好ましい、

[3] コラーゲンを、0.01M～0.1Mのリン酸塩および0.07M～0.14Mのナトリウム塩を含有する溶液に溶解し、これに同濃度のリン酸塩および同濃度のナトリウム塩を含有する遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド溶液を加えて1～10℃の温度下で攪拌することにより得られる部位特異的遺伝子変換促

進剤または遺伝子治療剤、

〔4〕細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法であって、前記遺伝子変換促進剤を当該細胞に接触させることを含む方法、

前記細胞は哺乳動物細胞、酵母または真菌であることが好ましい、

〔5〕少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤、

前記核内局在化促進剤は、リン酸塩を0.01M～0.1Mの範囲で含有すること、ナトリウム塩を0.07M～0.14Mの範囲で含有することが好ましい、

前記オリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体であり、粒子状の会合体の長径が300nm～50μmであることが好ましい、

前記核内局在化促進剤は、コラーゲンを0.01～1.0重量%の範囲で含有すること、あるいはコラーゲンを0.05～0.25重量%の範囲で含有することが好ましい、

〔6〕少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含む組成物を経口、経鼻、経肺、門脈内、筋肉内、皮下、臓器表面、臓器内または経皮投与することにより生体内の細胞と接触させ、当該細胞の遺伝子を変換する方法、

〔7〕前記〔6〕記載の方法を用いて遺伝子疾患を治療する方法。

図面の簡単な説明

第1図は、RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドおよびDNAオリゴヌクレオチドの構造を示す。

(a) RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチド、(b) 25mer DNAオリゴヌクレオチド、(c) 45mer DNAオリゴヌクレオチド、(d) 74mer DNAオリゴヌクレオチド。RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドのRNA部分(小文字)は2'-O-メチル-RNAに、DNAオリゴヌクレオチドの両端から3塩基(*)はホスホロチオエートになっており、分解を防いでいる。

第2図は、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドのHepG2細胞への取り込みを示す顕微鏡写真(a)および(b)と、比較のため、HVJ-リポソーム封入DNAオリゴヌクレオチドでの結果を示す顕微鏡写真(c)である。倍率は、

すべて100倍である。

第3図は、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドの性状を示す顕微鏡写真である。

(a) : DNAオリゴヌクレオチドのみ

(b) : 0.05% アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド74mer

第4図は、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドによる正常トランスサイレチンの産生を示すトランスジェニックマウス血清中のトランスサイレチンの質量分析結果を示すグラフである。

A : 無処置トランスジェニックマウスの血清から抽出したトランスサイレチン

B : アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを投与したトランスジェニックマウスの血清から抽出したトランスサイレチン

発明を実施するための最良の形態

本発明の第一の態様は、少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤に関するものである。

本発明において「コラーゲン」とは、通常、医療分野、化粧品分野、工業分野および食品分野で用いられているあらゆる「コラーゲン」を意味する。コラーゲンは、水溶性または可溶化コラーゲンをを用いることが好ましい。水溶性コラーゲンは、酸性または中性の水や塩溶液に可溶であり、可溶化コラーゲンは、酵素により可溶化される酵素可溶化コラーゲン、酸により可溶化される酸可溶化コラーゲン、アルカリにより可溶化されるアルカリ可溶化コラーゲンがあり、いずれも孔サイズが1マイクロメートルのメンブレンフィルターを通過できることが好ましい。コラーゲンの水溶性はコラーゲンの架橋度に依存し、架橋度が高いほど不溶化することから、本発明に使用するコラーゲンの架橋度は、例えば、3量体以下であることが好ましく、より好ましくは2量体以下である。コラーゲンの分子量は例えば、約30万から約90万が好ましく、約30万から約60万がより好ましい。コラーゲンはいかなる動物種から抽出されたものでも用いることが出来るが、好ましくは脊椎動物から抽出されたもの、さらに好ましくは哺乳類、鳥類、魚類から抽出されたもの、より好ましくは変性温度が高い哺乳類、鳥類から抽出されたコラーゲンが望ましい。コラーゲンのタイプもいかなるタイプのコ

ラーゲンでも良いが、動物体内の存在量から I ～ V 型が好ましい。具体的には例えば、哺乳動物の真皮から酸抽出した I 型コラーゲンが挙げられ、より好ましくは例えば、仔牛の真皮から酸抽出した I 型コラーゲン、遺伝子工学的に生産される I 型および III 型コラーゲンなどが挙げられる。また、安全性の面から抗原性の高いテロペプチドを酵素的に除去したアテロコラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産されるアテロコラーゲンが望ましい。また、必要に応じて側鎖を修飾したコラーゲン、架橋したコラーゲン等を用いることができる。側鎖を修飾したコラーゲンとしては、例えばサクシニル化またはメチル化したコラーゲン等が挙げられ、架橋したコラーゲンとしては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソアナートまたはポリエポキシ化合物等で処理したコラーゲン等を挙げることができる（フレグランス・ジャーナル 1989-12, 104-109、特公平 7-59522号公報）。

なお、前記コラーゲンには他の生体親和性材料を混合することもできる。生体親和性材料としては、例えばゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロース、ハイドロキシアパタイト、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリジメチルシロキサン、またはグリコール酸、乳酸もしくはアミノ酸の重合体もしくはこれらの共重合体、またはこれらの生体親和性材料の 2 種類以上の混合物等が挙げられる。

本発明における「遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド」とは、ゲノム遺伝子を変換させるに足りる長さで塩基配列を有する一本鎖のヌクレオチドである。前記オリゴヌクレオチドの長さは、少なくとも 20 塩基が好ましく、25 ～ 100 塩基がより好ましく、30 ～ 75 塩基がさらに好ましい。

前記オリゴヌクレオチドは、遺伝子変換の効率の観点から RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドまたは DNA オリゴヌクレオチドが好ましく、合成および精製の容易さから DNA オリゴヌクレオチドがより好ましい。

前記オリゴヌクレオチドは、生体内または細胞内でのヌクレアーゼに耐する安定性を高めるため、分子内に 1 個以上の核酸類似体を有しても良い。核酸類似体とは DNA 鎖あるいは RNA 鎖の酵素による分解を阻害することを目的としてデザイ

ンされた類似体である。例えば、リン酸ジエステル結合部位の酸素原子を一つイオウに置換したホスホロチオエート、メチル基に置換したメチルホスホネート、もしくはアミン基に置換したホスホロアミデート、またはリン酸ジエステル結合部位の二つの酸素原子をイオウに置換したホスホロジチオエート、もしくは一つのイオウ原子とメチル基に置換したメチルホスホロチオエート、または糖部分に化学修飾を施した2'-O-methyl RNA、2'-O-methoxyethyl RNA もしくはLocked nucleic acid (商品名) (LNA) 等を挙げることができる (バイオクリニカ、12, 166-170, 1997、Biochemistry, 41, 4503-4510, 2002)。核酸類似体がオリゴヌクレオチドに含まれる数をホスホロチオエート型核酸類似体を代表として表すと、ホスホロチオエート結合の数は、4～6個程度が好ましい。ホスホロチオエート結合は変異させる塩基から少なくとも3塩基以上離れた位置の両側に導入されることが望ましく、変異させる塩基に近づけると、却って遺伝子の変換効率が低下する傾向がある。より好ましくはオリゴヌクレオチドの両末端部位に2塩基以上連続してあることが望ましい。前記オリゴヌクレオチドは、塩基部分に化学修飾を施したものであってもよい。

前記オリゴヌクレオチドの設計は、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基対のミスマッチ対合をほぼ中央部に含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとなるようにすることが好ましい。

すなわち、変換対象のゲノム遺伝子の20塩基以上の塩基配列を選択し、当該配列の内部に位置する1～3塩基の塩基配列を所望する塩基配列に置換し、その余の塩基配列をワトソン・クリック型塩基対 (即ち、二本鎖) を形成する相補的配列に設計したオリゴヌクレオチドを設計することが好ましい。相補的配列は、ゲノム遺伝子のセンス鎖に対するものであってもアンチセンス鎖に対するものであってもよいが、センス鎖に対するものがより好ましい。このようなオリゴヌクレオチドとゲノム遺伝子とがワトソン・クリック型塩基対を形成すると、当該塩基対合中に1～3塩基対のミスマッチ対合を含むことになる。遺伝子の変換効率を高めるためには、前記ミスマッチ対合はオリゴヌクレオチドの中央部に位置することがより好ましい。

このような遺伝子変換用オリゴヌクレオチドを用いると、ゲノム遺伝子中の1～3塩基の変異を部位特異的に修復したり、逆にゲノム遺伝子中に1～3塩基の変異を部位特異的に導入することができる。前記変異が2塩基または3塩基の場合、当該変異は連続していてもよく、不連続であってもよい。

また、前記遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドの設計は、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基の欠失または挿入を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとなるようにすることが好ましい。

すなわち、変換対象のゲノム遺伝子の20塩基以上の塩基配列を選択し、当該配列の内部に位置する1～3塩基の塩基配列を欠失させるようにし、または当該配列の内部に1～3塩基の塩基配列を挿入するようにし、その余の塩基配列をワトソン・クリック型塩基対（即ち、二本鎖）を形成する相補的配列に設計したオリゴヌクレオチドを設計することが好ましい。相補的配列は、ゲノム遺伝子のセンス鎖に対するものであってもアンチセンス鎖に対するものであってもよいが、センス鎖に対するものがより好ましい。このようなオリゴヌクレオチドとゲノム遺伝子とがワトソン・クリック型塩基対を形成すると、当該塩基対合中に1～3塩基のループを含むことになる。遺伝子の変換効率を高めるためには、前記ループはオリゴヌクレオチドの中央部に位置することがより好ましい。

このような遺伝子変換用オリゴヌクレオチドを用いると、ゲノム遺伝子中の1～3塩基の変異を部位特異的に欠失したり、逆にゲノム遺伝子中に1～3塩基の変異を部位特異的に挿入することができる。前記変異が2塩基または3塩基の場合、当該変異は連続していてもよく、不連続であってもよい。

RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドの設計は、前記条件に加え、例えば図1(a)に示すように、センス鎖およびアンチセンス鎖それぞれとワトソン・クリック型塩基対を形成可能な2種の塩基配列部分と、塩基対を形成しない任意の介在配列部分とが連続した塩基配列を選択することができる。RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドの設計方法については、例えば、US 5, 731, 181、US 5, 756, 325に開示されている。

本発明の第二の態様は、少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレ

オチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤に関するものである。

本発明の遺伝子疾患治療剤に含まれるコラーゲンおよび遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドは、前記遺伝子変換促進剤に含まれるコラーゲンおよび遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドと同様である。

本発明の部位特異的遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤（以下、本発明の製剤ともいう）の剤型は、溶液状、懸濁液状、ゲル状、フィルム状、固形状（棒状、粉末状）等のいずれでもよく、用途によって選択される。例えば本発明の部位特異的遺伝子変換促進剤を用いて基材接着性細胞の遺伝子変換を行う場合には、溶液状態あるいは懸濁液状態の製剤を細胞の培養液に添加する方法の他、細胞へのオリゴヌクレオチドの接触を高めるために、基材表面にフィルム状あるいは粉末状の製剤を固定して用いられることが望ましい。また、浮遊細胞の遺伝子変換を行う場合には、溶液状態あるいは懸濁液状態の製剤を用いることが望ましい。剤形選択の重要性は、本発明の遺伝子疾患治療剤を生体に投与して遺伝子疾患の治療を行う場合更に大きくなる。全身の細胞を標的とした治療を行う場合、製剤は血管内に投与できるよう溶液状、懸濁液状が望ましいが、一般に遺伝子治療の分野では、予期し得ない副作用の発現の可能性を極力低減するために、例えば正常細胞では遺伝子変換を行わないオリゴヌクレオチドを用いた場合でも、遺伝子変換の必要がない細胞へのオリゴヌクレオチドの導入は好ましくないと考えられている。限定された部位の細胞に対してのみ遺伝子変換を行いたい場合には、局所的な製剤の濃度を高く維持し、かつ周囲への製剤の拡散を抑制できるゲル状、フィルム状、固形状の製剤を用いることが望ましい。また、患者の細胞をin vitroで本発明の遺伝子疾患治療剤で処理して所望の遺伝子変換を行い、遺伝子変換された細胞を患者に移植する際に遺伝子疾患治療剤を除去する必要がある場合には、除去の容易さからフィルム状あるいは固形状の剤形が望ましい。

これらの剤型の製造方法は、国際公開第01/97857号パンフレット（発明の名称：オリゴヌクレオチド導入製剤）に記載されており、本発明においてはいずれの製造方法を用いてもよい。

以下に、溶液状、懸濁液状、ゲル状の本発明の製剤として、好ましい態様について説明する。

本発明の製剤中のオリゴヌクレオチドが遺伝子変異を生じさせる機構は、オリゴヌクレオチドと遺伝子との相同組換え、あるいはオリゴヌクレオチドと遺伝子がハイブリッドを形成することによるミスマッチ修復によると考えられているがいずれかは定かではない。但しいずれの機構にせよ、オリゴヌクレオチドと遺伝子がオリゴヌクレオチドが標的としている部分でハイブリッドを形成する必要がある。通常、細胞が細胞分裂期になく、かつタンパク質を産生していない場合、遺伝子は安定な二重鎖を形成し、かつヒストンと相互作用することで高密度に凝集して核内に存在するため、外来のオリゴヌクレオチドが遺伝子の二重鎖を解離させて標的の遺伝子鎖とハイブリッドを形成することは期待できない。従って、本発明の製剤中のオリゴヌクレオチドが標的の遺伝子鎖とハイブリッドを形成して目的の遺伝子変異を行うには、オリゴヌクレオチドが核内に存在する期間中に細胞分裂に伴う遺伝子の複製、あるいはタンパク質産生に伴う遺伝子の転写のため、遺伝子の二重鎖が解離する必要がある。一般に細胞が外的要因で傷害を受けた場合、細胞のタンパク産生能及び細胞分裂能が著しく低下することが知られていることから、本発明の製剤は、製剤が接触しオリゴヌクレオチドを導入する細胞に傷害を与えないよう処方設計されることが望ましい。即ち、溶液状、懸濁液状、ゲル状の本発明の製剤は細胞と等張であることが望ましい。本発明の製剤にリン酸塩とナトリウム塩を含有する場合、リン酸塩0.1 Mからリン酸塩0.01 M、ナトリウム塩0.14 Mの範囲内で含有することが望ましく、リン酸塩0.05 M、ナトリウム塩0.07 Mからリン酸塩0.01 M、ナトリウム塩0.14 Mの範囲で含有することがより好ましい。

さらに、本発明の製剤は、遺伝子変換効率を高めるためには遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体となるように製造することが好ましい。ここで、「会合体」とは、分子中に多数の正電荷を帯びたコラーゲンと負電荷を帯びたオリゴヌクレオチドとが電氣的に引き合った複合体が他のコラーゲンと会合したものを意味する。この会合体の形成は、長径約300 nm、直径約1.5 nmの円柱状のコラーゲン分子が主として分子の長軸方向と平行に会合するものであり、主として会合体は分子の長軸方向に伸張する。したがって、会合体は、伸張の程度により繊維状、微繊維状および粒子状等の様々な形状をとる

ことができる。この中でも、本発明における会合体はオリゴヌクレオチドの細胞内、特に核内への移行効率の点から粒子状であることが好ましい。

前記粒子状の会合体の長径は、 300 nm ～ $50\text{ }\mu\text{ m}$ が好ましく、 300 nm ～ $30\text{ }\mu\text{ m}$ がより好ましい。

粒子状の会合体を形成させるためには、混合するコラーゲンとオリゴヌクレオチドの濃度と割合、塩濃度、温度、pHなどを調整する。

塩が存在しない場合、会合体の長径は混合時のコラーゲン濃度に依存するため、上記の好ましい長径の会合体を得るには、混合時のコラーゲンの濃度が 1.0 ～ 0.005 重量%、より好ましくは 0.5 ～ 0.005 重量%、更により好ましくは 0.05 ～ 0.005 重量%であることが望ましいが、コラーゲン濃度が低下するに従って会合体を形成するオリゴヌクレオチド濃度も低下する。より好ましい会合体を高濃度を得る方法として、予めコラーゲンを 0.01 M ～ 0.1 M リン酸塩および 0.07 M ～ 0.14 M ナトリウム塩を含有する溶液に溶解して微細なコラーゲン線維またはコラーゲン分子会合体を形成し、また場合によってコラーゲン分子を単分子状態で維持し、これにオリゴヌクレオチドを加えてコラーゲン線維、コラーゲン分子会合体またはコラーゲン単分子と会合体を形成する方法がある。また、コラーゲンの線維形成には温度が影響を与えるため、上記の好ましい長径の会合体を得るには、混合時の温度は 1 ～ 10°C が望ましく、より好ましくは 1 ～ 5°C である。

従って、本発明の溶液状の製剤は、コラーゲンを、 0.01 M ～ 0.1 M リン酸塩および 0.07 M ～ 0.14 M ナトリウム塩を含有する溶液に溶解し、これに同濃度のリン酸塩および同濃度のナトリウム塩を含有する遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド溶液を加えて 1 ～ 10°C の温度下で攪拌することにより得られる。

混合時のコラーゲンの濃度は、通常 $50\text{ }\mu\text{ g/ml}$ ～ 10 mg/ml であり、混合時のオリゴヌクレオチドの濃度は、通常 $20\text{ }\mu\text{ g/ml}$ ～ 1 mg/ml である。

会合体を形成したコラーゲン分子数とオリゴヌクレオチドのヌクレオチドモノマー数との比は、 $1:1$ ～ $1:200$ であり、好ましくは $1:3$ ～ $1:150$ 、

より好ましくは1 : 3 ~ 1 : 120である。

混合時の溶液のpHは、pH5 ~ 9、好ましくはpH6 ~ 8である。

このような条件下で本発明の製剤を製造することにより、粒子状の会合体を含む溶液状の製剤を提供することができる。

前記溶液状の製剤中のコラーゲンの濃度は、主にインビトロでの遺伝子変換やオリゴヌクレオチドの核内局在に使用する場合、0.01 ~ 1.0重量%の範囲で含有することが好ましい。

前記溶液状の製剤中のコラーゲンの濃度は、主にインビボでの遺伝子変換、遺伝子治療やオリゴヌクレオチドの核内局在に使用する場合、0.01 ~ 0.25重量%の範囲で含有することが好ましい。

更に本発明の溶液状製剤は、オリゴヌクレオチドの安定化のためにEDTAを0.01 ~ 1重量%、容器及び投与器具への吸着防止のため界面活性剤を0.01 ~ 1重量%含有することができる。

以下に、フィルム状、固形状（棒状、粉末状）の本発明の製剤として、好ましい態様について説明する。

フィルム状、固形状製剤は上記の溶液状製剤を濃縮、乾燥して得られる。即ち上記の溶液状製剤を平面なプレート上にキャストして、40℃以下の温度で乾燥させることによりフィルム状の製剤を調製できる。また、溶液状製剤を遠心してオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を沈殿させ、その沈殿物を40℃以下で乾燥させることで粉末状の製剤を調製できる。このようにして得られた粉末状の製剤あるいは溶液状製剤を凍結乾燥して得られたスポンジ状化合物を圧縮して棒状の製剤を調製する方法、あるいは粉末状の製剤とスポンジ状製剤に少量の水を加えて練合して高濃度の溶液とし、ノズルから押し出して40℃以下で乾燥させて棒状の製剤を調製することができる。

フィルム状、固形状製剤では、溶液状製剤に含有された添加剤に加えて、製剤の形状を保つ目的で、アルブミン、ゼラチン、コンドロイチン硫酸、アガロース、ソルビトール、スクロース等の製剤上許容される添加剤を製剤全体の10 ~ 80重量%の範囲で含有できる。

粉末状製剤の粒子径は、賦形剤により様々な形状を取り得るが、含有されるオ

リゴヌクレオチドとコラーゲンが形成する会合体の長径は、 $300\text{ nm}\sim 50\text{ }\mu\text{ m}$ が好ましく、 $300\text{ nm}\sim 30\text{ }\mu\text{ m}$ がより好ましい。

また、棒状の固形状製剤は局所に注射的に投与できるように、直径が $0.1\text{ mm}\sim 2.0\text{ mm}$ 、長さ $3\text{ mm}\sim 20\text{ mm}$ が望ましく、直径が $0.3\text{ mm}\sim 1.0\text{ mm}$ 、長さ $3\text{ mm}\sim 10\text{ mm}$ がより望ましい。

固形製剤に含有されるオリゴヌクレオチドの量は、通常固形製剤 1 mg あたり $10\text{ }\mu\text{ g}\sim 100\text{ }\mu\text{ g}$ 、コラーゲン量は、通常固形製剤 1 mg あたり $990\text{ }\mu\text{ g}\sim 250\text{ }\mu\text{ g}$ である。

本発明の第三の態様は、細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法に関する。すなわち、本発明の変換方法は、本発明の部位特異的遺伝子変換促進剤を細胞に接触させることにより、当該促進剤中に含まれるオリゴヌクレオチドを接触した細胞の核内に移入、局在させ、所望の塩基の変換を行うことを特徴とする。

変換対象の細胞は、真核細胞であれば特に制限されるものではなく、酵母、真菌、植物細胞および動物細胞などが挙げられるが、好ましくは哺乳動物細胞、酵母または真菌である。

特定の塩基が変換されたかどうかは、本発明の遺伝子変換促進剤を接触させて一定の期間後に細胞を回収し、PCR法等により特定の塩基を含む遺伝子領域を増幅して調べることができる。

本発明の遺伝子治療剤は、種々の遺伝子疾患の治療に使用することができる。治療対象の疾患としては、遺伝子の点変異（ $1\sim 3$ 塩基の変異を含む）、欠失変異または挿入変異（ $1\sim 3$ 塩基の変異を含む）により正常なタンパク質が発現されないことに起因する疾患があげられる。そのような疾患としては家族性ポリアミロイドニューロパチー（FAP）、ファブリー病、ウイルソン病、サラセミア、鎌形赤血球症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、第五因子ライデン異常症、ビオチン依存性マルチプルカルボキシラーゼ欠損症等が挙げられる。

FAPの場合、点変異によりトランスサイレチン（TTR）の30番目のバリンがメチオニンに変異した異型TTRに起因する疾患（I型FAP）や、TTRの84番目のイソロイシンがセリンに変異した異型TTRに起因する疾患（II型

FAP) などが代表例として挙げられる。また、FAPに関しては、これまで90種を超える様々なTTRの点変異によるFAPが報告されており、本遺伝子治療剤は、これらすべてのタイプのFAPに適用可能である。TTRは、主に肝臓で産生されることから、肝細胞を標的として本発明の遺伝子治療剤を投与することができる。また、異型TTRによるアミロイド沈着は眼の硝子体の白濁等を伴う視力障害をも引き起し、この障害は、本発明の遺伝子治療剤を直接眼の網膜に投与することにより治療することができる。

本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、治療目的に応じて経皮、皮下、皮内、経鼻、経肺、筋肉内、脳内、組織（臓器表面、臓器内）、血管内（静脈内、門脈内）または経口投与することができる。

本発明の遺伝子治療剤の投与量は、溶液状製剤の場合はその液量で、フィルム状剤型の場合はその面積で、棒状製剤の場合はその径と長さで、さらに粉末状製剤の場合はその粉体体積もしくは重量で容易に調節することができる。

本発明の遺伝子治療剤の最適な投与量は、適応疾患、投与部位、投与方法、剤型の種類、患者の性別、年齢、症状などによって異なるが、製剤中のオリゴヌクレオチドの量としては、患者に対して例えば、 $0.001\text{ mg/kg} \sim 40\text{ mg/kg}$ 、好ましくは $0.01\text{ mg/kg} \sim 30\text{ mg/kg}$ である。

投与後の遺伝子治療剤中のオリゴヌクレオチドは、効率よくゲノム遺伝子中の変異を変換する、すなわち、変異を修復することができる。FAPの場合、遺伝子の修復の結果正常なTTRが産生され、異型TTR量は低下して、アミロイドの形成を抑制することにより、FAPの症状が改善される。

本発明の第四の態様は、少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤を提供する。本製剤においては、オリゴヌクレオチドは前記遺伝子変換用オリゴヌクレオチドの条件に合致するように設計されたものを使用することができるが、オリゴヌクレオチドとしての通常の長さを有する任意のオリゴヌクレオチドも好適に使用することができる。

本製剤は、前記遺伝子変換促進剤と同様に種々の剤型をとることができるが、溶液状の剤型が好ましい。溶液状の本製剤に含まれるリン酸塩およびナトリウム塩の濃度は、前記と同様である。また、その他の条件（コラーゲンの濃度、コラ

ーゲン分子数とオリゴヌクレオチドモノマー数との比、混合時の溶液のpHおよび温度など）は、前記と同様である。

本製剤を細胞に接触させることにより、製剤中に含まれるオリゴヌクレオチドを細胞の核内に効率的に局在させることができる。オリゴヌクレオチドが細胞の核内に局在したかどうかは、当該オリゴヌクレオチドを蛍光色素等で標識しておき、蛍光顕微鏡等により観察することにより確認することができる。

実施例

以下、実施例等により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。実施例において、コラーゲン濃度を示す％は、重量％を意味する。

製造例 1

部位特異的遺伝子変換促進剤の調製

下記試験例および実施例で使用するFAPに関連するTTRの遺伝子の部位特異的変換促進剤およびファブリー病に関連する α -ガラクトシダーゼの遺伝子の部位特異的変換促進剤を調製した。配列番号2～12に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド3.83～50 μ Mと10 μ g/ml～1g/mlのアテロコラーゲンとを等量、0.14Mの塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）中で2℃で混合し、オリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤（アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド）を調製した。

実施例 1

HepG2 細胞での遺伝子変換率

1) 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド

FAPで最も多くみられるのは、TTRの30番目のパリンがメチオニンへ変異したFAP type I (FAP ATTR Val30Met)である。そこで、正常TTR遺伝子を有するHepG2 細胞の正常TTR遺伝子をATTR Val30Met を発現するように変換するため、図1 (b)～(d)に示すようなDNAオリゴヌクレオチドを設計した。DNAオリゴヌクレオチドの最適な長さを検討するために、25mer（配列番号：2）、45mer（配列番号：3）、74mer（配列番号：4）の3種類を合成した

。また、前記オリゴヌクレオチドは、ヒトTTR遺伝子に基づいて設計されたものであり、マウスおよびウサギTTR遺伝子に基づいて設計して合成した74merは、それぞれ配列番号：5および配列番号：6に記載している。

2) トランスフェクション方法

HepG2 細胞への遺伝子導入効率を検討するために、導入するオリゴヌクレオチドの5'末端をFITCで標識した。Fugene6 (Roche 製)、ExGen 500 (MBI Fermentas 製)、HVJ-リポソーム (大阪大学大学院医学系研究科、遺伝子治療学、金田安史博士より供与) または製造例1で調製したアテロコラーゲン製剤 (FITCで標識したオリゴヌクレオチドを含有) を用いて、トランスフェクション法の最適化を検討した。

3) DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞における遺伝子変換率の検討

前日に 2×10^5 のHepG2 細胞 (大日本製薬より購入) を12 well plate にまき、0.1 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド74mer ($3.83 \mu\text{M}$) を $300 \mu\text{l}$ および $600 \mu\text{l}$ ずつトランスフェクションし、5日 ($300 \mu\text{l}$ 添加時) あるいは6日 ($600 \mu\text{l}$ 添加時) 後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、変異配列に相当する塩基が3'末端になるように設計した変異DNA特異的オリゴヌクレオチドを用いて異常アレル (ATTR Val30Met) のみ効率よく増幅するように設定したMASA法 (mutant allele specific amplification) とreal time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

4) アテロコラーゲンに包埋したオリゴヌクレオチドの性状の検討

$8 \mu\text{l}$ のアテロコラーゲンとオリゴヌクレオチドとの会合体 (製造例1で調製したもの) を、一本鎖DNAを染色する5倍希釈の一本鎖核酸染色蛍光試薬YOYO (モレキュラープローブ社) $2 \mu\text{l}$ と混合し、蛍光顕微鏡下で観察した。

5) DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞における遺伝子変換の最適条件の検討

前日に 2×10^5 のHepG2 細胞を12 well plate にまき、0.1 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{M}$ 25mer, $10 \mu\text{M}$ 45mer, $10 \mu\text{M}$ 74mer)、または0.5 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($50 \mu\text{M}$ 25mer, $25 \mu\text{M}$ 45mer, $10 \mu\text{M}$ 74mer) を $600 \mu\text{l}$ (培養液 $600 \mu\text{l}$) ずつトランスフェクシヨ

ンし、5日後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、MASA法とreal time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

以上の実験結果に基づき、遺伝子の変換効率の確認を行った。

(A) オリゴヌクレオチドの細胞核内への局在率

HepG2 細胞へのDNAオリゴヌクレオチドの核内局在率は、Fugene6、ExGen 500、HVJ-リポソームおよびアテロコラーゲン製剤の中で、図2(a)、(b)に示すようにアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドがほぼ50%のHepG2細胞に取り込まれ、更に導入されたDNAオリゴヌクレオチドが核に局在していることがわかる。他の方法ではすべてこれよりも弱い蛍光を示し、核への局在率が低かった。

(B) DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞における遺伝子変換率

これまでの報告では、DNAオリゴヌクレオチドを使った実験では、最適なDNAオリゴヌクレオチドの長さを調べるために、25mer～74merのDNAオリゴヌクレオチドを使って遺伝子修復の効率を比較検討しており、45mer、74merのDNAオリゴヌクレオチドが比較的遺伝子修復率が高いことが知られていることから、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド74mer（配列番号：4）を用いて、HepG2細胞における遺伝子変換率を調べたところ、前記3）の条件下では300 μ l 及び600 μ l のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチド濃度：3.83 μ M）を添加した場合、それぞれ0.5%及び1%弱の遺伝子変換率であったのに対し、前記5）（オリゴヌクレオチド濃度：10 μ M）では製剤中のアテロコラーゲン濃度を0.1%から0.5%に上げ、600 μ l のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを600 μ l の細胞培養液に添加することにより遺伝子変換率が1%から10%に上昇した。本製剤を用いた遺伝子変換率は、一定のレベルまで用量依存的に上昇することが考えられる。尚、遺伝子変換率はアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド25mer（配列番号：2）ではアテロコラーゲン濃度が0.1%（DNAオリゴヌクレオチド濃度：10 μ M）のとき0%、0.5%（DNAオリゴヌクレオチド濃度：50 μ M）のとき約0.5%、45mer 配列番号：3）ではアテロコラーゲン濃度が0.1%（DNAオリゴヌクレオチド濃度：10 μ M）のとき0%、0.5%（DNAオ

リボヌクレオチド濃度：25 μ M) のとき約1%であった。

これらの結果は、本発明の用いるDNA オリゴヌクレオチドの鎖長は、45mer以上が望ましく、より望ましくは74mer 以上であることを示している。

(C) アテロコラーゲンに包埋したDNAオリゴヌクレオチドの性状の検討

前記4) の蛍光顕微鏡による観察の結果を図3に示す。図3よりDNA オリゴヌクレオチド単独では全く粒子は観察されないのに対して、0.05% アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド(配列番号：5) では、会合体粒子が観察され、会合体粒子の平均長径は18.73 μ mであった。

実施例2

DNAオリゴヌクレオチドによる家兎の眼における遺伝子変換の検討

家兎の前眼房水を除去した後、0.5%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド(10 μ M 74mer、配列番号：6) または1%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド(30 μ M 74mer)を硝子体に直接注入(左眼)、あるいは硝子体切除後の硝子体に注入(右眼)した。1ヶ月後に眼を摘出し、RNAを抽出し、逆転写酵素を用いて、first strand cDNA を合成した。このcDNAを鋳型として、MASA法とreal time PCR を用いて、正常TTRおよびATTR Val30Met のコピー数を決めることで遺伝子変換率を算定した。

遺伝子変換率は、ATTR Val30Met のコピー数/(ATTR Val30Met のコピー数+正常TTR遺伝子のコピー数) \times 100 (%)で算定した。1%アテロコラーゲンで包埋した74mer のDNAオリゴヌクレオチドの方が0.5%アテロコラーゲンで包埋した74mer のDNAオリゴヌクレオチドよりも遺伝子変換率が高かった。また、硝子体切除を施行した方がより高い遺伝子変換率(約1%)を示した。

実施例3

マウス肝臓における遺伝子変換の検討

正常および異常マウストランスサイレチン(ATTR Val30Met) 遺伝子を有するヘテロトランスジェニックマウスならびに異常マウストランスサイレチン遺伝子を有するホモトランスジェニックマウス(変異導入マウスを用いた遺伝性アミロイドーシス発症機構の解析、前田秀一郎ら、厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業「アミロイドーシスに関する研究」平成13年度総括研究報告書、p39-

41) に下記製剤 1 ～ 3 を投与し、遺伝子変換率を調べた。

オリゴヌクレオチド：遺伝子変換を行う塩基を中央に配し、両末端 3 塩基をホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとした 7 4mer (配列番号：5)

製剤：製剤 1：オリゴヌクレオチド 10 μ M, アテロコラーゲン 0.5%

製剤 2：オリゴヌクレオチド 10 μ M, アテロコラーゲン 0.2%

製剤 3：オリゴヌクレオチド 10 μ M, アテロコラーゲン 0.05%

投与方法：マウスの肝臓の一つの肝葉の二ヶ所に 0.2ml ずつ前記製剤を直接投与 (トータル 0.4ml) した。

3 週間飼育後、製剤を投与した肝葉と、製剤を投与していない肝葉を採取して遺伝子を抽出し、MASA法とreal time PCR を用いて両肝葉について全トランスサイレチン遺伝子中の正常遺伝子の割合を測定した。

また、3 週間飼育後、無処置のホモトランスジェニックマウス (マウスのトランスサイレチン遺伝子 ATTR Val30Metのもの) および製剤を投与したホモトランスジェニックマウスより血液を採取し、血清に抗トランスサイレチン抗体を加え免疫沈降をさせ抽出したトランスサイレチンを質量分析装置 (matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight mass spectrometry) を用いて解析し、正常トランスサイレチンが産生されているかどうかを検討した。

結果：製剤 3 投与ヘテロトランスジェニックマウスの両肝葉での正常遺伝子の割合は、製剤を投与した肝葉で 60.7%、製剤を投与していない肝葉で 51% であった。従って、10% の遺伝子修復効果が得られたと考えられる。製剤 2 投与マウスは飼育中に死亡した (原因不明)。製剤 1 投与マウスでも遺伝子修復効果が得られたが僅かであった。製剤 3 投与ホモトランスジェニックマウスの両肝葉での遺伝子の正常化率は、製剤を投与した肝葉で 8.7%、製剤を投与していない肝葉で 0% であった。したがって、約 9% の遺伝子修復効果が得られた。また、質量分析の結果、未処置のトランスジェニックマウスでは ATTR V30M の 13,672 Da のピークを認めたが (図 4A)、製剤 3 を投与したトランスジェニックマウスでは 13,672 Da のピークに加えて、Met が Val に修復することで分子量 32 Da マイナスにシフトした 13,640 Da (図 4B, ↓) のピークを認めた。これらの結果は、アテロコラーゲン包埋 DNA オリゴヌクレオチドを肝臓に直接投与することで、異常

トランスサイレチン遺伝子が修復され、正常トランスサイレチンが産生されたことを示しており、本発明のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドには、FAP の治療効果があるといえる。

実施例 4

HepG2 細胞での遺伝子変換率 (2)

1) 遺伝子変換促進剤の調製

DNAオリゴヌクレオチドとして51mer のYKS-384 (配列番号: 7)、配列番号7において1, 2, 3, 47, 49 および50位をLocked nucleic acid (商品名) (LNA) に置換したYKS-382、ならびに配列番号7において1, 2, 3, 10, 11, 12, 14, 34, 35, 38, 47, 49および50位をLocked nucleic acid (商品名) (LNA) に置換したYKS-383の3種類を合成した。また、前記オリゴヌクレオチドは、ヒトTTR遺伝子に基づいて設計されたものである。前記製造例1に記載の方法により、前記3種類のオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤 (0.5%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド (10 μ M)) を調製した。

2) HepG2 細胞における遺伝子変換率の検討

前日に 2×10^5 のHepG2 細胞 (大日本製薬より購入) を12 well plate にまき、前記1) で調製した0.5%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド51mer (10 μ M) を600 μ l ずつトランスフェクションし、6 日後に細胞を回収した。対照としてDNAオリゴヌクレオチド (YKS-384 (配列番号: 7) 単独の溶液を調製し、この溶液を用いて同様にトランスフェクションした。回収した細胞からDNAを抽出し、変異配列に相当する塩基が3' 末端になるように設計した変異DNA特異的オリゴヌクレオチドを用いて異常アレル (ATTR Val30Met) のみ効率よく増幅するように設定したMASA法 (mutant allele specific amplification) とreal time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

以上の実験結果に基づき、遺伝子の変換率の確認を行ったところ、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド中のDNAオリゴヌクレオチドとしてYKS-384を用いた場合は4%、6個のLNAを含むYKS-382では10%、13個のLNAを含むYKS-383では23%であった。YKS-384単独で

は遺伝子変換が起こらなかった。

実施例 5

DNAオリゴヌクレオチドによるHepG2 細胞におけるTTR 遺伝子上の50番目及び114番目のアミノ酸変換をコードした塩基の変換率の検討

実施例1の検討により、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを用いることで、HepG2 細胞におけるTTR 遺伝子上の30番目のアミノ酸をコードした塩基の変換が、DNAオリゴヌクレオチドを単独で用いた場合に比べて促進できることが明らかになったことから、FAP の原因となるTTR 遺伝子上の他のアミノ酸をコードした塩基の変換が、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを用いることで促進できることを検討した。

1) 遺伝子変換促進剤の調製

DNAオリゴヌクレオチドとして、トランスサイレチン遺伝子の50番目のセリンがイソロイシンに変異したFAP ATTR Ser 50 Ile 及び114番目のチロシンがシステインに変異したFAP ATTR Tyr 114 Cysの遺伝子を正常化する効果を検討するために、ヒトTTR 遺伝子に基づいてDNA オリゴヌクレオチド74mer（配列番号：8、9、遺伝子変換を行う塩基を中央に配し、両末端3塩基をホスホロチオエートオリゴヌクレオチド）を合成した。前記製造例1に記載の方法により、前記2種類のDNAオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤（0.5%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド（10 μ M））を調製した。

2) HepG2 細胞における遺伝子変換率の検討

前日に2 $\times 10^5$ のHepG2 細胞を12 well plate にまき、1) で調製した0.5 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド（10 μ M 74mer）とDNAオリゴヌクレオチド（10 μ M 74mer）とを600 μ l（培養液600 μ l）ずつトランスフェクションし、5日後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、MASA法とreal time PCR を用いて遺伝子変換率を算定した。

ヒトトランスサイレチン遺伝子上の50番目のアミノ酸をコードした塩基を変換できるように設計したDNA オリゴヌクレオチド（配列番号：8）、ヒトトランスサイレチン遺伝子上の114番目のアミノ酸をコードした塩基を変換できるよ

うに設計したDNA オリゴヌクレオチド（配列番号：9）を各々、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド（アテロコラーゲン濃度：0.5%、DNAオリゴヌクレオチド濃度：10 μ M）及びDNAオリゴヌクレオチド単独でHepG2細胞に添加した。結果、塩基の変換率は、ヒトトランスサイレチン遺伝子上の50番目のアミノ酸をコードした塩基を変換できるように設計したDNAオリゴヌクレオチドでは、DNAオリゴヌクレオチド単独で0%、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドで1.61%、ヒトトランスサイレチン遺伝子上の114番目のアミノ酸をコードした塩基を変換できるように設計したDNAオリゴヌクレオチドでは、DNAオリゴヌクレオチド単独で0%、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドで0.58%であった。この結果は、本発明のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドは、塩基変異部位が異なる場合でもDNAオリゴヌクレオチドによる塩基変換を促進できることを示している。更にこのことは、本発明はタイプの異なるFAPに対して治療薬を提供できることを示している。

実施例6

ヒト網膜上皮細胞における遺伝子変換率の検討

実施例1の検討により、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを用いることで、HepG2細胞におけるTTR遺伝子上の30番目のアミノ酸をコードした塩基の変換が、DNAオリゴヌクレオチドを単独で用いた場合に比べて促進できることが明らかになった。一方、FAPでは異常なTTRは肝臓だけでなく網膜でも産生されることから、ヒト網膜細胞でもTTR遺伝子上の塩基の変換が、アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドを用いることで促進できることを検討した。

1) 遺伝子変換促進剤の調製

ヒトTTR遺伝子に基づいたDNAオリゴヌクレオチド（配列番号：4）について、前記製造例1に記載の方法により、DNAオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤（0.5%、0.25%、0.1%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド（10 μ M））を調製した。

2) ヒト網膜上皮細胞における遺伝子変換率の検討

前日に 2×10^5 cellのヒト網膜上皮細胞 (ARPE 19株) を12 well plate にまき、0.1 %、0.25%、0.5 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{M}$ 74mer) を600 μl (培養液600 μl) ずつトランスフェクションし、5日後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、MASA法とreal time PCRを用いて遺伝子変換率を算定した。

アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドをヒト網膜上皮細胞に添加した場合、塩基の変換率は、アテロコラーゲン濃度が0.1 %の時0 %、0.25 %の時5.91 %、0.5 %の時2.08 %であった。この結果は、本発明のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドは、ヒト肝臓細胞だけでなくヒト網膜細胞でもDNAオリゴヌクレオチドによる塩基変換を促進できることを示している。

実施例 7

ファブリー病に関連する遺伝子変異の変換率の検討

1) 遺伝子変換促進剤の調製

DNAオリゴヌクレオチドとしてファブリー病で見られる α -ガラクトシダーゼ遺伝子の変異に基づいて125番目または374番目のアミノ酸を変換するDNAオリゴヌクレオチド (配列番号: 10または11、遺伝子変換を行う塩基を中央に配し、両末端3塩基をホスホロチオエートオリゴヌクレオチド) を合成した。前記実施例6に記載の方法により、前記3種類のオリゴヌクレオチドとコラーゲンの会合体を含む溶液製剤 (0.1 %、0.25 %、0.5 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{M}$)) を調製した。

2) ファブリー病患者由来ヒト繊維芽細胞における遺伝子変換率の検討

製剤投与当日に約50%の細胞密度となるように前日に播種したファブリー病患者由来のヒト繊維芽細胞を12 well plate にまき、0.1 %、0.25%、0.5 %アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド ($10 \mu\text{M}$ 74mer) を600 μl (培養液600 μl) ずつトランスフェクションし、7日後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、MASA法とreal time PCRを用いて遺伝子変換率を算定した。

3種類のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドをヒト繊維芽細胞に

添加した場合、塩基の変換率は次の通りであった。

125 番目のアミノ酸を変換するDNAオリゴヌクレオチド（配列番号：10）

アテロコラーゲン濃度：塩基変換率

0.1%：0%、0.25%：0%、0.5%：0.95%

374 番目のアミノ酸を変換するDNAオリゴヌクレオチド（配列番号：11）

アテロコラーゲン濃度：塩基変換率

0.1%：1.3%、0.25%：0%、0.5%：0%

この結果は、本発明のアテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチドは、ファブリー病に関連する遺伝子変異に対してもDNAオリゴヌクレオチドによる塩基変換を促進できることを示している。更にこのことは、本発明はファブリー病に対してその治療薬を提供できることを示している。

参考例 1

MASA法を利用したreal time PCR により算出した遺伝子変換率の妥当性評価

1) 実施例 1 の 5) で 0.5%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド (10 μ M 74mer) を添加したHepG2 細胞から抽出したDNAを用いて、TTR 遺伝子のエクソン2 (変異部位のエクソン) を増幅し、DH5 α 細胞にトランスフォームした。得られたコロニーからプラスミドDNAを精製し、制限酵素Nsi 1で切断することにより、正常TTR 遺伝子からATTR Val30Met 遺伝子への変換率を検討した。その結果、60コロニーのうち50コロニーに遺伝子変換が認められ (8.3%)、MASA法を利用したreal time PCRの結果 (10%) とほぼ同じ結果が得られた。

2) FAP ATTR Val30Met ホモ接合体患者から得られたDNAを正常者のDNAで希釈して得られた100%、10%、1%ATTR Val30Met 遺伝子をスタンダードとして、50%、25%、12.5%、6.25%、3.125%ATTR Val30Met 遺伝子についてMASA法を利用したreal time PCRを行い、理論値と測定値の相関を検討した。結果、理論値と計算値は一次の相関を示し、相関係数0.9956と良好な相関を認めた。

3) real time PCRにおいて、系中に残存したDNAオリゴヌクレオチドがテンプレートとして働いてPCR産物が生じ、結果として遺伝子変換が生じたよう

に計算される可能性を否定するため、DNAオリゴヌクレオチド（配列番号：4）をテンプレートとしてreal time PCRを行なった。結果、DNAオリゴヌクレオチドをテンプレートとして使用した場合は、当初から緩やかな上昇カーブが見られ、融解曲線解析によるPCR産物の T_m 値がスタンダード遺伝子（ATTR Val130Met）と全く異なることから、DNAオリゴヌクレオチドはテンプレートとして働かないことが明らかになった。

以上の結果より、MASA法を利用したreal time PCRにより算出した遺伝子変換率の妥当性が検証された。

産業上の利用可能性

本発明により、細胞のゲノム遺伝子上に存在する特定の塩基対を部位特異的に変換する遺伝子変換促進剤および遺伝子疾患治療剤が提供される。本発明の製剤は、生体内分解性でかつ低抗原性であり、既に生体に投与した場合の高い安全性が確認されているコラーゲンを用いることにより、オリゴヌクレオチドが極めて高い効率で細胞内に導入されて核に局在化でき、ゲノム遺伝子の変換を効率的に促進することができる。本発明の製剤は、オリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤としても有用である。これらの製剤を使用することにより、遺伝子治療、遺伝子変異動物および植物の作出が可能である。

請求の範囲

1. 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子変換促進剤。
2. 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含んでなる部位特異的遺伝子疾患治療剤。
3. コラーゲンが水溶性コラーゲンである、請求項1または2に記載の促進剤または治療剤。
4. 水溶性コラーゲンがアテロコラーゲンである、請求項3に記載の促進剤または治療剤。
5. 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが少なくとも20塩基からなるオリゴヌクレオチドである、請求項1～4いずれかに記載の促進剤または治療剤。
6. 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドがRNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドまたはDNAオリゴヌクレオチドである、請求項1～5いずれかに記載の促進剤または治療剤。
7. 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基対のミスマッチ対合を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項5または6に記載の促進剤または治療剤。
8. 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドが、変換する遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖と、1～3塩基の欠失または挿入を含んでワトソン・クリック型塩基対を形成する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、請求項5または6に記載の促進剤または治療剤。
9. 前記ミスマッチ対合がオリゴヌクレオチドの中央部に位置する、請求項7に記載の促進剤または治療剤。
10. 前記塩基の欠失または挿入がオリゴヌクレオチドの中央部に位置する、請求項8に記載の促進剤または治療剤。
11. 剤型が溶液状である、請求項1～10いずれかに記載の促進剤または治療剤。

12. リン酸塩を0.01M~0.1Mの範囲で含有する請求項11記載の促進剤または治療剤。
13. ナトリウム塩を0.07M~0.14Mの範囲で含有する請求項11記載の促進剤または治療剤。
14. 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項11~13いずれかに記載の促進剤または治療剤。
15. 粒子状の会合体の長径が300nm~50μmである請求項14記載の促進剤または治療剤。
16. コラーゲンを0.01~1.0重量%の範囲で含有する請求項11~15いずれかに記載の促進剤または治療剤。
17. コラーゲンを0.01~0.25重量%の範囲で含有する請求項11~15いずれかに記載の促進剤または治療剤。
18. コラーゲンを、0.01M~0.1Mのリン酸塩および0.07M~0.14Mのナトリウム塩を含有する溶液に溶解し、これに同濃度のリン酸塩および同濃度のナトリウム塩を含有する遺伝子変換用のオリゴヌクレオチド溶液を加えて1~10℃の温度下で攪拌することにより得られる部位特異的遺伝子変換促進剤または遺伝子治療剤。
19. 剤型が固形状であり、遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項1~10いずれかに記載の促進剤または治療剤。
20. 遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項19に記載の促進剤または治療剤。
21. 粒子状の会合体の長径が300nm~50μmである請求項20に記載の促進剤または治療剤。
22. 細胞の核内においてゲノム遺伝子上の特定の塩基を任意に変換する方法であって、請求項1、3~21いずれかに記載の遺伝子変換促進剤を当該細胞に接触させることを含む方法。
23. 前記の細胞が哺乳動物細胞である請求項22に記載の方法。
24. 前記の細胞が酵母または真菌である請求項22に記載の方法。

25. 少なくともコラーゲンとオリゴヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの核内局在化促進剤。

26. リン酸塩を0.01M~0.1Mの範囲で含有する請求項25に記載の核内局在化促進剤。

27. ナトリウム塩を0.07M~0.14Mの範囲で含有する請求項25または26に記載の核内局在化促進剤。

28. 前記オリゴヌクレオチドとコラーゲンが粒子状の会合体である請求項25~27いずれかに記載の核内局在化促進剤。

29. 粒子状の会合体の長径が300nm~50 μ mである請求項28に記載の核内局在化促進剤。

30. コラーゲンを0.01~1.0重量%の範囲で含有する請求項25~29いずれかに記載の核内局在化促進剤。

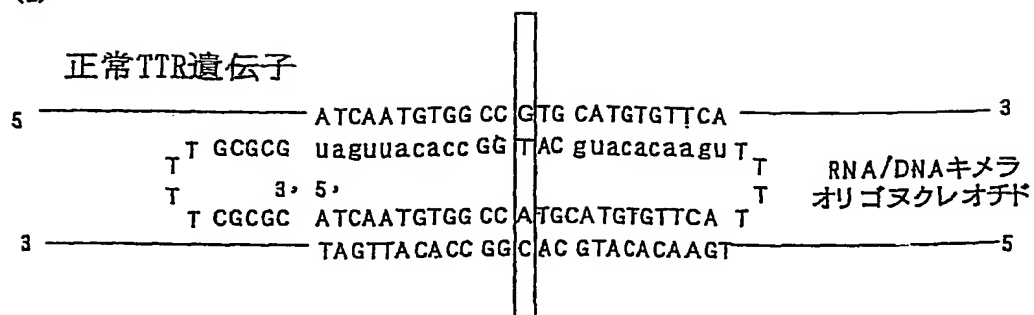
31. コラーゲンを0.05~0.25重量%の範囲で含有する請求項25~29いずれか記載の核内局在化促進剤。

32. 少なくともコラーゲンと遺伝子変換用のオリゴヌクレオチドを含む組成物を経口、経鼻、経肺、門脈内、筋肉内、皮下、臓器表面、臓器内または経皮投与することにより生体内の細胞と接触させ、当該細胞の遺伝子を変換する方法。

33. 請求項32記載の方法を用いて遺伝子疾患を治療する方法。

Fig 1

(a)

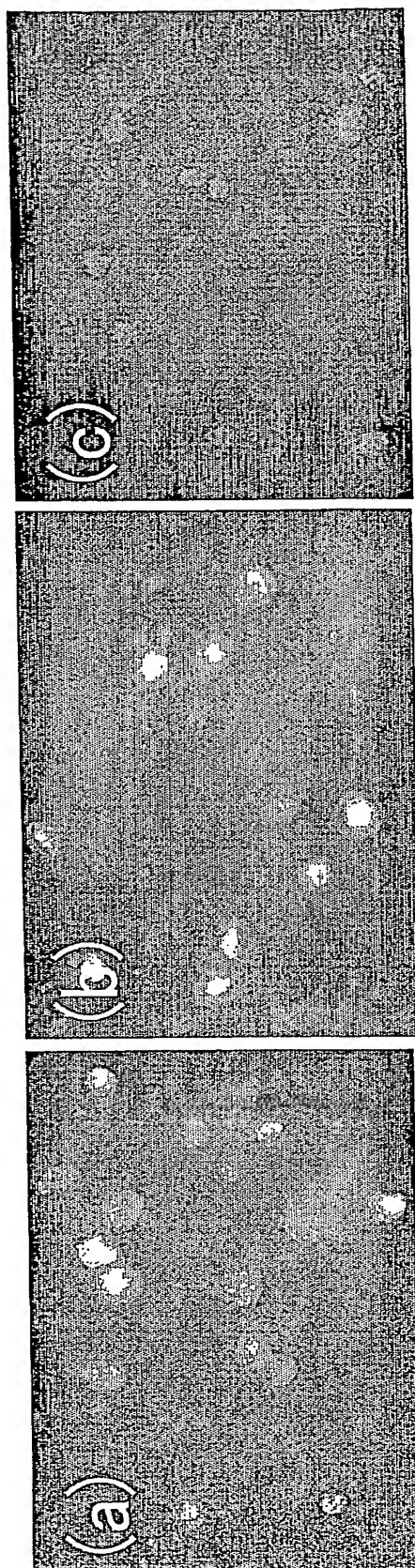


(b) 5'-T*G*A* ACA CAT GCA TGG CCA CAT TG*A* T*-3'

(c) 5'-G*C*A* GCC TTT CTG AAC ACA TGC ATG GCC ACA TTG ATG GCA GGA C*T*G*-3'

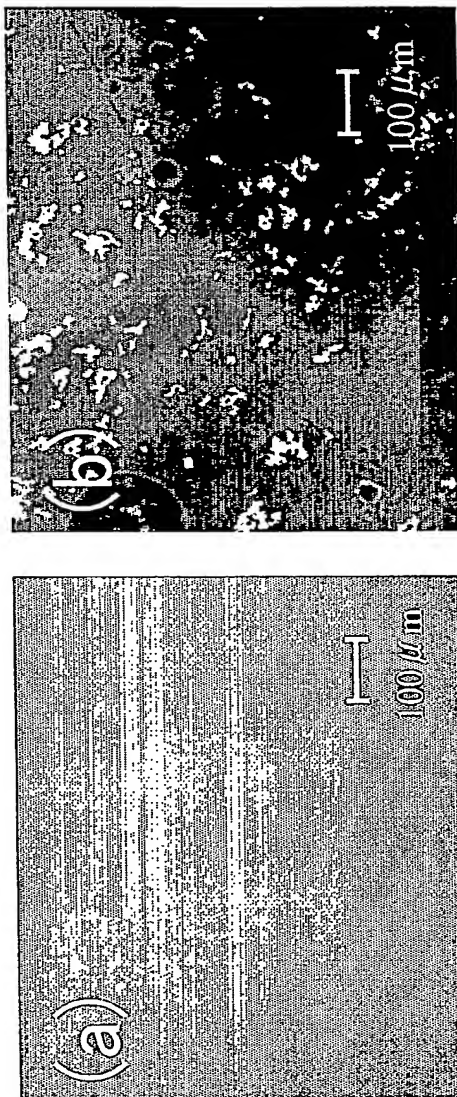
(d) 5'-T*C*C* CAG GTG TCA TCA GCA GCC TTT CTG AAC ACA TGC ATG GCC ACA TTG ATG GCA GGA CTG CTT CGG ACA GCA* T*C*-3'

Fig 2

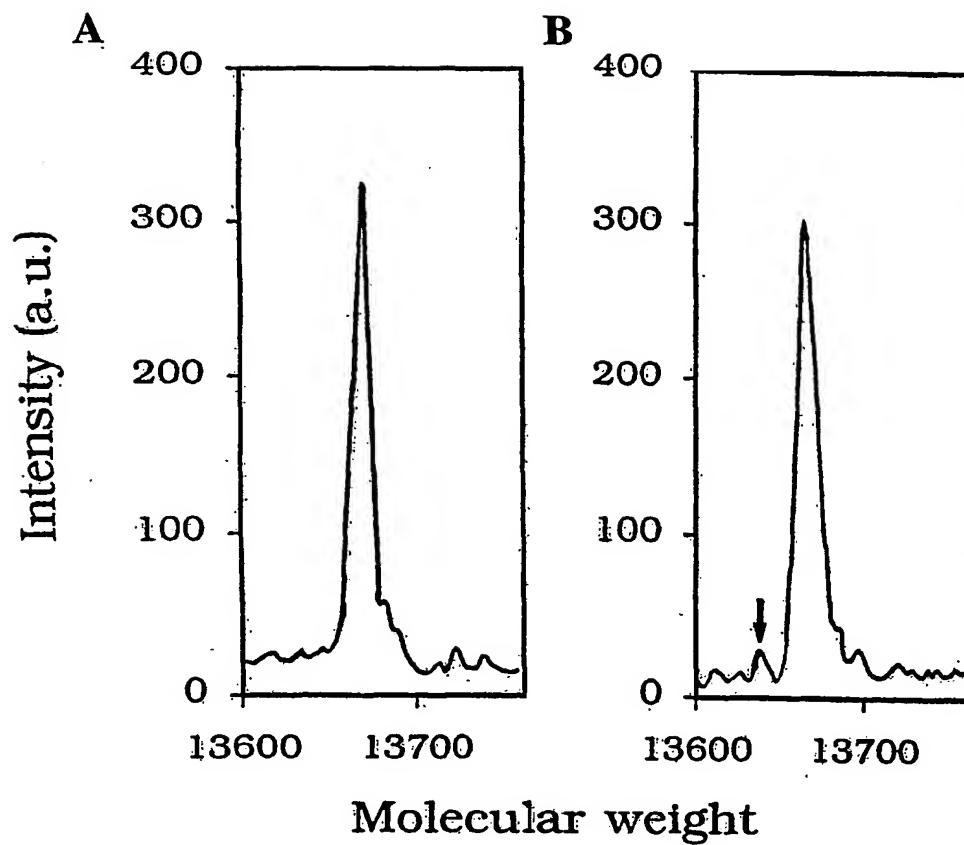


- (a) 0.01%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド
(b) 0.1%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド
(c) HVJ-リポソーム封入DNAオリゴヌクレオチド

Fig 3



(a) DNAオリゴヌクレオチド
(b) 0.05%アテロコラーゲン包埋DNAオリゴヌクレオチド

Fig. 4

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.
Koken Co., Ltd.

<120> An agent for accelerating site directed gene conversion
and a therapeutic agent of genetic disease

<130> PCT0316SP

<150> JP 2002-274926
<151> 2002-9-20

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (29)..(39)
<223> Description of Artificial Sequence:2'-O-methyl-RNA

<220>
<222> (45)..(54)
<223> Description of Artificial Sequence:2'-O-methyl-RNA

<400> 1
atcaatgtgg ccatgcatgt gttcattttu gaacacaugc atggccacau ugaugcgcggt 60
tttcgcgc 68

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (1)..(3)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
<222> (23)..(25)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 2
tgaacacatg catggccaca ttgat 25

<210> 3

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <222> (1)..(3)
 <223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
 <222> (43)..(45)
 <223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 3
 gcagcctttc tgaacacatg catggccaca ttgatggcag gactg 45

<210> 4
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <222> (1)..(3)
 <223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
 <222> (72)..(74)
 <223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 4
 tcccaggtgt catcagcagc ctttctgaac acatgcatgg ccacattgat ggcaggactg 60
 cctcggacag catc 74

<210> 5
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <222> (1)..(3)
 <223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
 <222> (72)..(74)
 <223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 5
 tcccaggatc cctcagaggt ctttttgaac actttcacag ccacgtctac agcagggctg 60
 cctcggacag catc 74

<210> 6
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (1)..(3)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
<222> (72)..(74)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 6
tcccaggtct catcagcagc ctttttgaac acgtgcatag acacgtcgac tgcaggactg 60
cctcggacgg catc 74

<210> 7
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA oligonucleotide

<400> 7
tcagcagcct ttctgaacac atgcatggcc acattgatgg caggactgcc t 51

<210> 8
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (1)..(3)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
<222> (72)..(74)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 8
ctcctcagtt gtgagcccat gcagctctcc agactcaatg gttttcctat aaggtgtgaa 60
agtctggatt aagt 74

<210> 9
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (1)..(3)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
<222> (72)..(74)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 9
cttgggattg gtgacgacag ccgtgggtgga ataggagcag gggtcagca gggcggcaat 60
ggtgtagcgg cggg 74

<210> 10
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (1)..(3)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
<222> (72)..(74)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 10
gcagtcaagg ttgcacatga agcgctccca gtgcagccag cccatggtag gcgtccttgc 60
caatccattg tcca 74

<210> 11
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<222> (1)..(3)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<220>
<222> (72)..(74)
<223> Description of Artificial Sequence:Phosphorothioate linkage

<400> 11
gccatgatag cccagagggc catctgagtt acttgctgat tccagctgag gccaaagttg 60
ccaatcacta actg 74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 31/7088, 47/42, 9/08, 9/14, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 31/70-31/7088, 47/00-47/42, 9/00-9/14,
A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN),
JSTPLUS (JOIS), WPI (DIALOG), DDBJ/GenBank/EMBL, SwissProt/PIR/PDB,
GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 1295611 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 19 June, 2001 (19.06.01), Claims; examples; Par. No. [0035] & WO 01/97857 A1 & AU 200164317 A	25-31 1-21
X Y	WO 01/34206 A2 (CMIC CO., LTD.), 17 May, 2001 (17.05.01), Claims; examples & JP 2001-199903 A & AU 200113034 A & EP 1229941 A2 & BR 200015419 A & KR 2002060733 A & CN 1390141 A	25-31 1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 October, 2003 (17.10.03)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95/15972 A1 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY), 15 June, 1995 (15.06.95), Claims; examples & JP 9-506511 A & AU 9513995 A & EP 733059 A1 & NZ 278490 A & CN 1215755 A & CN 1142829 A	1-21, 25-31
Y	WO 97/48714 A1 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY), 24 December, 1997 (24.12.97), Claims; examples & JP 2000-512853 A & EP 968224 A1 & US 5731181 A & US 5795972 A & AU 9734920 A & CN 1222158 A & NZ 333201 A & KR 2000011075 A	1-21, 25-31
Y	Yukio ANDO et al., "RNA/DNA Chimeraoligonucleotide ni yoru Kazokusei Amyloidopolyneuropathy(FAP) no Idenshi Chiryo no Kisoteki Kenkyu", Kosei Kagaku Kenkyuhi Hojokin Tokutei Shikkan Taisaku Kenkyu Jigyo Amyloidosis ni Kansuru Kenkyu Heisei 13 Nendo Sokatsu Kenkyu Hokokusho, 2002 March, pages 28 to 30	1-21, 25-31
Y	GAMPER, H.B. et al, The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/ conversion activity in mammalian and plant cell- free extracts., Nucleic Acids Research, 2000, 28(21), pages 4332 to 4339; full text	1-21, 25-31
Y	KREN, B.T. et al., Correction of the UDP- glucuronosyltrans-ferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1999, 96, pages 10349 to 10354; full text	1-21, 25-31
Y	Yasushi KANEDA, "Idenshi Chiryo to Sonogo no Shinpo Idenshi Donyuho -Liposome-", Biotherapy, 1994, 8(10), pages 1265 to 1272; page 1266, right column, line 12 to page 1267, right column, last line; Fig. 3	25-31
Y	Yasushi KANEDA, "Seitainai Soshiki eno Chokusetsuteki Idenshi Donyu, Experimental Medicine, 1994, 12(2), pages 184 to 192; page 185, lines 2 to 8; Fig. 1	25-31
P, Y	TAUBES, G., The Strange Case of Chimeraplasty., Science, 2002, 298, pages 2116 to 2120	1-21, 25-31
A	BENSON, M.D. Familial amyloidotic polyneuropathy., Trends in Neurosciences, 1989, 12, pages 88 to 92	1-21, 25-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRAASCH, D.A. et al., Novel Antisense and Peptide Nucleic Strategies for Controlling Gene Expression., Biochemistry, 2002, 41(14), pages 4503 to 4510	1-21, 25-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11962

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22-24, 32, 33

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions according to these claims involve a method of administering a composition having a gene to the human body and thus pertain to methods for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ A61K48/00, 31/7088, 47/42, 9/08, 9/14, A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ A61K48/00, 31/70-31/7088, 47/00-47/42, 9/00-9/14, A61P1/00-43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), JSTPLUS (JOIS), WPI (DIALOG), DDBJ/GenBank/EMBL, SwissProt/PIR/PDB, GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	EP 1295611 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited) 2001.06.19, 請求の範囲, 実施例, [0035], & WO 01/97857 A1 & AU 200164317 A	25-31 1-21
X Y	WO 01/34206 A2 (CMIC CO., LTD.) 2001.05.17, 請求の範囲, 実施例, & JP 2001-199903 A & AU 200113034 A & EP 1229941 A2 & BR 200015419 A & KR 2002060733 A & CN 1390141 A	25-31 1-21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 17.10.03		国際調査報告の発送日 04.11.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 荒木 英 則 電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 95/15972 A1 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY) 1995.06.15, 請求の範囲, 実施例, & JP 9-506511 A & AU 9513995 A & EP 733059 A1 & NZ 278490 A & CN 1215755 A & CN 1142829 A	1-21, 25-31
Y	WO 97/48714 A1 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY) 1997.12.24, 請求の範囲, 実施例, & JP 2000-512853 A & EP 968224 A1 & US 5731181 A & US 5795972 A & AU 9734920 A & CN 1222158 A & NZ 333201 A & KR 2000011075 A	1-21, 25-31
Y	安東由喜雄ら. RNA/DNAキメラオリゴヌクレオチドによる家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の遺伝子治療の基礎的研究. 厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 アミロイドーシスに 関する研究 平成13年度総括研究報告書, 2002年3月, pp.28-30	1-21, 25-31
Y	GAMPER, H. B., <i>et al.</i> The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. Nucleic Acids Research, 2000, 28(21), pp.4332-4339, 全文参照	1-21, 25-31
Y	KREN, B. T., <i>et al.</i> Correction of the UDP-glucuronosyltrans- ferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1999, 96, pp.10349-10354, 全文参照	1-21, 25-31
Y	金田安史. 遺伝子治療とその後の進歩 遺伝子導入法ーリポソームー. Biotherapy, 1994, 8(10), pp.1265-1272, 1266頁右欄12行 ー1267頁右欄最下行, 図3	25-31
Y	金田安史. 生体内組織への直接的遺伝子導入. 実験医学, 1994, 12(2), pp.184-192, 185頁2行ー8行, 図1	25-31
PY	TAUBES, G. The Strange Case of Chimeraplasty. Science, 2002, 298, pp.2116-2120	1-21, 25-31
A	BENSON, M. D. Familial amyloidotic polyneuropathy. Trends in Neurosciences, 1989, 12, pp.88-92	1-21, 25-31
A	BRAASCH, D. A., <i>et al.</i> Novel Antisense and Peptide Nucleic Strategies for Controlling Gene Expression. Biochemistry, 2002, 41(14), pp.4503-4510	1-21, 25-31

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 22-24, 32, 33 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
これらの請求の範囲に係る発明は組成物を人間の体内へ遺伝子を投与する方法を包含するものであり、人間の身体を処置する方法に包含されるものである。
(P C T 17条(2)(a)(i)、P C T規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。